

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2000-229880  
(P2000-229880A)

(43) 公開日 平成12年8月22日 (2000.8.22)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード* (参考)
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 P 19/10		31/00	6 1 9 E 4 H 0 4 5
43/00			6 4 3 A
C 0 7 K 14/47	Z N A		6 4 3 C
		C 0 7 K 14/47	Z N A

審査請求 未請求 請求項の数1 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平11-33262

(22) 出願日 平成11年2月10日 (1999.2.10)

(71) 出願人 000006699

雪印乳業株式会社

北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

(72) 発明者 木野崎 雅彦

栃木県河内郡上三川町ゆうきが丘53-8

(72) 発明者 後藤 雅昭

栃木県下都賀郡石橋町下古山456-1

(72) 発明者 山口 京二

埼玉県大宮市島町702-12 ライオンズガ  
ーデン東大宮1-524

(72) 発明者 森田 修司

栃木県下都賀郡石橋町大松山1-3-3  
S Kマンション3-C

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨形成促進剤

(57) 【要約】

【課題】 新規な骨形成促進剤の提供。

【解決手段】 スタンニオカルシン (S T C) を有効成分とする骨形成促進剤。

【効果】 骨粗鬆症などの骨量減少性疾患の予防及び／又は治療剤として有用。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 スタンニオカルシン（STC）を有効成分とする骨形成促進剤。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、スタンニオカルシン（STC）を有効成分とする骨形成促進剤に関する。

【0002】

【従来の技術】骨代謝は、骨形成を担当する骨芽細胞と骨吸収を担当する破骨細胞の総合された活性に依存している。骨形成と骨吸収の均衡が崩れることにより、骨代謝異常が発生すると考えられている。骨代謝の異常による疾患としては、骨粗鬆症、高カルシウム血症、骨ページェット病、腎性骨異常症、慢性関節リウマチ、及び変形性関節炎などが知られている。これらの骨代謝異常疾患の代表として知られる骨粗鬆症は、破骨細胞による骨吸収が骨芽細胞による骨形成を上まわることにより発生する疾患であり、骨の石灰質と骨基質とが等しく減少することを特徴とする。この疾患の発生メカニズムについては未だ完全には解明されていない。又、この疾患は骨の疼痛が発生し、骨の脆弱化による骨折が起こる疾患である。高齢人口の増加に伴い、骨折による寝たきり老人の原因となるこの疾患は社会問題にもなっており、その治療薬の開発が急務となっている。このような骨代謝異常による骨量減少症は、骨吸収の抑制、骨形成の促進、あるいはこれらのバランスの改善により治療できることが期待される。即ち、骨形成は、骨形成を担当する骨芽細胞の増殖及び分化機能を促進すること、破骨細胞前駆細胞からの破骨細胞への分化成熟を抑制すること、あるいは破骨細胞の骨吸収活性などの機能を抑制することにより促進されると期待される。このような活性を有するホルモン、低分子物質、あるいは生理活性蛋白質について、現在精力的な探索及び開発研究が進められている。

【0003】骨に関わる疾患の治療及び治療期間の短縮を図る医薬品として、既にカルシトニン製剤、活性型ビタミンD3製剤、エストラジオールを含有するホルモン製剤、イブリフラボン、ビタミンK2、ビスフォスフォネート系化合物などがあり、さらに、より副作用が少なく、有効性に優れた治療薬の開発を目指して、活性型ビタミンD3誘導体、エストラジオール誘導体、第2世代又は第3世代のビスフォスフォネート系化合物などの臨床試験が実施されている。

【0004】しかし、これらの薬剤を用いた治療法は、その効果並びに治療結果において必ずしも満足出来るものではなく、より安全かつ有効性の高い新しい治療薬の開発が期待されている。又、骨代謝疾患の治療に使用されている薬剤の中には、その副作用により治療可能な疾患が限定されているものもある。更に現在、骨粗鬆症などの骨代謝疾患の治療は、複数の薬剤を同時に使用する

多剤併用療法が主流になってきている。このような観点から、従来の医薬品とは異なった作用メカニズムを持ち、しかもより有効性が高くかつ副作用の少ない医薬品の開発が期待されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、上述の状況に鑑み鋭意研究の結果、ミネラル代謝を調節する蛋白質として知られているスタンニオカルシン（Stanniocalcin；STC：Olsen H.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.93, p1972 (1996)）に、優れた骨芽細胞増殖促進活性を見出した。即ち本発明は、スタンニオカルシン（STC）を有効成分とする骨形成促進剤を提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、スタンニオカルシン（STC）を有効成分とする骨形成促進剤に関する。本発明により、優れた骨芽細胞増殖促進活性を有する製剤が提供され、骨粗鬆症などの骨量減少疾患の予防及び／又は治療剤として有用である。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明の有効成分であるスタンニオカルシンは、Olsen H.S.らの方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.93, p1972 (1996)）により得ることができる。具体的には、上述の文献あるいは遺伝子バンク等を検索することにより、スタンニオカルシンのcDNA配列を知ることができ、その配列情報に基づいて、PCR法等を用いてスタンニオカルシンのcDNAを得ることができる。得られたcDNAを挿入した発現ベクターを動物細胞等にトランスフェクトして、スタンニオカルシン発現細胞を得ることができる。得られたスタンニオカルシン発現細胞を培養した培養液から常法により精製することにより、スタンニオカルシンを得ることができる。尚、スタンニオカルシンには、同一の遺伝子を発現した場合でも複数のN末端アミノ酸配列が存在することが知られている（Junli Zhang et al., PROTEIN EXPR. AND PURIFICATION, 12, pp390-398 (1998)）が、本発明の実施に当たってはN末端アミノ酸配列の違いは何ら影響せず、いずれのN末端配列を有するもの、あるいはそれらの混合物であっても良い。

【0008】本発明の有効成分であるスタンニオカルシンは、骨粗鬆症などの骨量減少疾患の予防及び／又は治療を目的とした医薬組成物として、ヒト及び動物に対して安全に投与されるものである。スタンニオカルシンは、製剤化して経口的あるいは非経口的に投与することができる。医薬組成物の形態としては、注射用組成物、点滴用組成物、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤などが挙げられる。これらの製剤は、公知の製剤学的製法に準じ、製剤として薬理学的に許容され得る担体、賦形剤、安定剤、着色剤、界面活性剤、その他添加剤などを用いることにより、目的とする製剤とすることができ

る。注射用組成物の場合は、本発明の有効成分であるスタンニオカルシンの薬理学的有効量及び製剤学的に許容し得る賦形剤／賦活剤との混合物とし、その中にアミノ酸、糖類、セルロース誘導体、及びその他の有機／無機化合物などの一般的に注射用組成物に添加される賦形剤／賦活剤を用いても良い。必要に応じてpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤などを添加し、常法によって各種注射剤とすることができる。

#### 【0009】

【実施例】以下の実施例をもって本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示するのみであり、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

#### 【0010】

##### 【実施例1】スタンニオカルシンの製造

##### i) IMR-90細胞からのポリ(A) + RNA の単離

ファストトラックmRNAアイソレーションキット (Invitrogen社) を用い、そのマニュアルに従って  $1 \times 10^8$  個のIMR-90細胞より約  $10 \mu\text{g}$  のポリ(A) + RNA を単離した。

##### 【0011】ii) ヒトスタンニオカルシン発現ベクターの構築

単離したポリ(A) + RNA、 $1 \mu\text{g}$  を鋳型としてスーパースク립トIIcDNA合成キット (ギブコBRL社) を用いて、同社のプロトコールに従って一本鎖cDNAを合成し、このcDNAとプライマーSTCF1N (配列表配列番号1) 及びプライマーSTCR1Xh (配列表配列番号2) を用いて、PCRを行い、STC cDNA断片を取得した。以下にPCRの条件を示す。

#### 【0012】

10X Ex Taqバッファー (宝酒造社)	10	$\mu\text{l}$
2.5 mM dNTP	8	$\mu\text{l}$
cDNA溶液	1	$\mu\text{l}$
Ex Taq (宝酒造社)	0.5	$\mu\text{l}$
蒸留水	74.5	$\mu\text{l}$
20 $\mu\text{M}$ プライマーSTCF1N	5	$\mu\text{l}$
100 $\mu\text{M}$ プライマーSTCR1Xh	1	$\mu\text{l}$

上記の溶液を微量遠心チューブ中で混合後、以下の条件でPCRを行った。95℃で3分前処理後、95℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で2分間の3段階の反応を30回繰り返した後、70℃で5分間保温した。反応液の一部をアガロース電気泳動し約900bpの均一なDNA断片が得られたことを確認した。この断片を常法によりシーケンシングし、スタンニオカルシンをコードするcDNAが得られたことを確認した。cDNA配列を配列表配列番号3に、アミノ酸配列を配列表配列番号4にそれぞれ示す。

【0013】得られた約900bpのDNA断片を、QIAEXI DNA extraction kit (QIAGEN社) によって精製した。このDNA断片を制限酵素XhoIおよびNheI (宝酒造社) で切断し、QIAEXII DNA extraction kitにより精製した (STC XhoI-NheI 断片)。STC XhoI-NheI 断片をXhoIおよびNheIで切断した pCEP4 (Invitrogen社) に、ligati

on kit ver.2 (宝酒造社) により結合させてpCEPSTCを得た。このプラスミドは、スタンニオカルシンをコードするDNAを含んでいる。このプラスミドを含む大腸菌 (DH5 $\alpha$ ; ギブコBRL社) は、DH5 $\alpha$ /pCEP-STCとして平成10年8月11日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERMP-16933として寄託されている。尚、PCR由来のDNA部分に、DNA合成時における塩基の誤った取り込みがない事を、DNAシーケンシングにより確認した。

#### 【0014】iii) ヒトスタンニオカルシンの生産

実施例1-ii) で得られたpCEPSTCを持つ大腸菌DH5 $\alpha$ を、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン (シグマ社) を含むLB培地 (1%バクトートリプトン、0.5%バクトーイーストエクストラクト、1%NaCl) 500ml中で37℃一晩振盪培養し、菌体からプラスミドDNAをQIAGEN Plasmid Mega kit (QIAGEN社) により精製した。293-EBNA細胞 (Invitrogen社) を10%牛胎児血清を含むIMDM (ライフテクノロジーズ社) 中  $1 \times 10^6$  /20mlとなるように75 $\text{cm}^2$  T-フラスコに播種し、37℃一晩、CO<sub>2</sub> インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>) 中で培養した。pCEPSTCをFuGENE6 (ベーリンガーマンハイム社) を用いて、293-EBNA細胞にトランスフェクトした。DNAは各7 $\mu\text{g}$ 、FuGENE6は20 $\mu\text{l}$  用いた。トランスフェクションした293-EBNA細胞を37℃で1日間CO<sub>2</sub> インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>) 中で培養した後、無血清培地に交換しさらに2日間培養し、スタンニオカルシンを含む培養液を得た。得られた培養液からスタンニオカルシンを精製し、精製標品がスタンニオカルシンであることを、プロテインシーケンサー (プロサイス492型、パーキンエルマー社) で確認した。

#### 【0015】

##### 【実施例2】スタンニオカルシンの骨芽細胞系細胞増殖活性

骨芽細胞系細胞の増殖活性は以下の方法により測定した。即ち、マウス骨芽細胞様細胞であるMC3T3-E1細胞 (RIKEN CELL BANK RCB1126) 及びヒト骨肉腫由来細胞であるHOS細胞 (ATCC CRL-1543) をそれぞれ10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM (GIBCO BRL社製) 中、 $2 \times 10^3$  個/100 $\mu\text{l}$ /ウェルで96ウェルプレートにまき、37℃で一晩培養した。その後各ウェルを血清を含まない $\alpha$ -MEMで洗った後、そのウェルに100 $\mu\text{l}$ の血清を含まない $\alpha$ -MEMを加え、さらに2日間培養した。2日後、各ウェルの培地を0.2%牛血清アルブミンを含む $\alpha$ -MEMに交換し、そこに0.2%牛血清アルブミンを含む $\alpha$ -MEMで希釈した実施例1で得られたスタンニオカルシンを添加し、さらに22時間培養を続けた。22時間後、<sup>3</sup>H-チミジン (Amersham社製) を1 $\mu\text{Ci}$ /ウェルとなるように添加し、さらに2時間培養した。2時間後、細胞をPBSで洗った後、0.5%トリプシンで細胞をはがし、セルハーベスター (パッカー社) を使い細胞をガラスフィルターに回収し

た。各ウェル中の細胞に取り込まれた放射能を、マトリックス96（パッカード社）を用い測定し、その値をDNA合成量とした。結果を図1及び図2に示す。

【0016】この結果、スタンニオカルシンを添加することにより、濃度依存的に各細胞への<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みが上昇し、DNA合成が上昇していることが確認された。従って、スタンニオカルシンを用いることにより、骨芽細胞を増殖させることができる。

#### 【0017】

【発明の効果】本発明により、スタンニオカルシン（STC）を有効成分とする骨形成促進剤が提供される。本発明製剤は、骨粗鬆症などの骨量減少性疾患の予防及び／又は治療剤として有用である。

#### 【0018】

#### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

```

<;110>; 雪印乳業株式会社 Snow Brand Milk Products Co., Ltd.
<;120>; 骨形成促進剤
<;130>; YTP98024
<;160>; 4
<;210>; 1
<;211>; 29
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized DNA
<;400>; 1
      GGGGCTAGCC AACAACTTAG CGGAAACTT          29
<;210>; 2
<;211>; 29
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized DNA
<;400>; 2
      CCCCTCGAGT GTGTCAACAC CCCTAAAAT          29
<;210>; 3
<;211>; 741
<;212>; DNA
<;213>; Homo Sapiens
<;300>;
<;301>; Olsen H. S. et al.
<;302>; Human stanniocalcin : a possible hormonal regulator of mineral metabolism.
<;303>; Proc. Natl. Acad. Sci. USA
<;304>; 93
<;305>; 5
<;306>; 1792
<;307>; 1996-03-05
<;308>; GenBank, U46768
<;309>; 1996-02-22
<;400>; 3
atgtctcaaa actcagcagt gcttctggtg ctggtgatca gtgcttctgc aacctatgag 60
gcggagcaga atgactctgt gagccccagg aaatcccagag tggcggccca aaactcagct 120
gaagtgggtc gttgctcaa cagtgtctta caggtcggct gcggggcttt tgcatgcctg 180
gaaaactcca cctgtgacac agatgggatg tatgacatct gtaaatcctt cttgtacagc 240

```

gctgctaaat ttgacactca gggaaaagca ttctgcaaag agagcttaaa atgcatcgcc 300  
 aacgggggtca cctccaaggt cttctcgcgc attcggaggt gctccacttt ccaaaggatg 360  
 attgtctgagg tgcaggaaga gtgctacagc aagctgaatg tgtgcagcat cgccaagcgg 420  
 aaccttgaag ccatcactga ggtcgtccag ctgcccaatc acttctccaa cagatactat 480  
 aacagacttg tccgaagcct gctggaatgt gatgaagaca cagtcagcac aatcagagac 540  
 agcctgatgg agaaaattgg gcctaacatg gccagcctct tccacatcct gcagacagac 600  
 cactgtgccc aaacacaccc acgagctgac ttcaacagga gacgcaccaa tgagcccgag 660  
 aagctgaaag tctcctcag gaacctccga ggtgaggagg actctccctc ccacatcaaa 720  
 cgcacatccc atgagagtgc a 741

&lt;;210&gt;; 4

&lt;;211&gt;; 247

&lt;;212&gt;; PRT

&lt;;213&gt;; Homo Sapiens

&lt;;300&gt;;

&lt;;301&gt;; Olsen H. S. et al.

&lt;;302&gt;; Human stanniocalcin : a possible hormonal regulator of mineral metabolism.

&lt;;303&gt;; Proc. Natl. Acad. Sci. USA

&lt;;304&gt;; 93

&lt;;305&gt;; 5

&lt;;306&gt;; 1792

&lt;;307&gt;; 1996-03-05

&lt;;400&gt;; 4

Met Leu Gln Asn Ser Ala Val Leu Leu Val Leu Val Ile Ser Ala Ser  
                                   5                                  10                                  15  
 Ala Thr His Glu Ala Glu Gln Asn Asp Ser Val Ser Pro Arg Lys Ser  
                                   20                                  25                                  30  
 Arg Val Ala Ala Gln Asn Ser Ala Glu Val Val Arg Cys Leu Asn Ser  
                                   35                                  40                                  45  
 Ala Leu Gln Val Gly Cys Gly Ala Phe Ala Cys Leu Glu Asn Ser Thr  
                                   50                                  55                                  60  
 Cys Asp Thr Asp Gly Met Tyr Asp Ile Cys Lys Ser Phe Leu Tyr Ser  
                                   65                                  70                                  75                                  80  
 Ala Ala Lys Phe Asp Thr Gln Gly Lys Ala Phe Val Lys Glu Ser Leu  
                                   85                                  90                                  95  
 Lys Cys Ile Ala Asn Gly Val Thr Ser Lys Val Phe Leu Ala Ile Arg  
                                   100                                  105                                  110  
 Arg Cys Ser Thr Phe Gln Arg Met Ile Ala Glu Val Gln Glu Glu Cys  
                                   115                                  120                                  125  
 Tyr Ser Lys Leu Asn Val Cys Ser Ile Ala Lys Arg Asn Pro Glu Ala  
                                   130                                  135                                  140  
 Ile Thr Glu Val Val Gln Leu Pro Asn His Phe Ser Asn Arg Tyr Tyr  
                                   145                                  150                                  155                                  160  
 Asn Arg Leu Val Arg Ser Leu Leu Glu Cys Asp Glu Asp Thr Val Ser  
                                   165                                  170                                  175  
 Thr Ile Arg Asp Ser Leu Met Glu Lys Ile Gly Pro Asn Met Ala Ser  
                                   180                                  185                                  190  
 Leu Phe His Ile Leu Gln Thr Asp His Cys Ala Gln Thr His Pro Arg  
                                   195                                  200                                  205  
 Ala Asp Phe Asn Arg Arg Arg Thr Asn Glu Pro Gln Lys Leu Lys Val

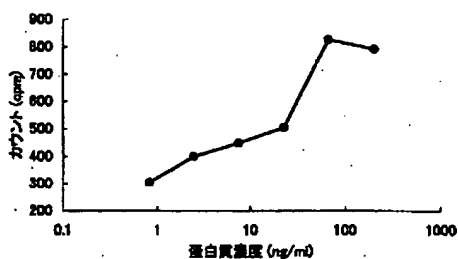
210 215 220  
 Leu Leu Arg Asn Leu Arg Gly Glu Glu Asp Ser Pro Ser His Ile Lys  
 225 230 235 240  
 Arg Thr Ser His Glu Ser Ala  
 245

【図面の簡単な説明】

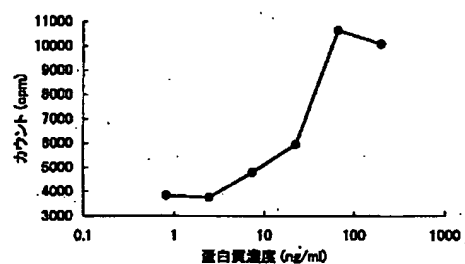
【図1】 実施例2における、スタンニオカルシン（S  
 TC）を添加した時のMC3T3-E1細胞のDNA合  
 成量を示す。

【図2】 実施例2における、スタンニオカルシン（S  
 TC）を添加した時のHOS細胞のDNA合成量を示  
 す。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 中川 信明  
 栃木県下都賀郡石橋町石橋578-15 西浦  
 ハイツ2-4

Fターム(参考) 4C084 AA02 BA44 CA53 DB01 MA31  
 MA52 MA57 MA59 MA63 MA66  
 NA05 NA06 ZA962 ZA972  
 4H045 AA30 BA10 CA40 EA27 FA72  
 FA74

Identifier: AAB23264 Protein Sequence 247 AA  
 Release Info: Derwent Geneseq Database Release No. 200208; Date released 12-APR-02  
 Database WPI; 2000-605236/58.;N-PSDB; AAA97594.  
 XReference:  
 Accession Number: AAB23264  
 Patent Title: An osteogenesis promoter useful in the prevention and/or treatment of bone diseases such as osteoporosis -  
 Patented by: (SNOW ) SNOW BRAND MILK PROD CO LTD.  
 Inventor:  
 Description: Human stanniocalcin.  
 Patent Number: JP2000229880-A  
 Patent Publication 22-AUG-2000  
 Date:  
 Modification Date: 02-FEB-2001 (first entry)  
 Local Filing: 10-FEB-1999; 99JP-0033262  
 Priority: 10-FEB-1999  
 Abstract: The invention relates to a novel osteogenesis-promoting composition which contains stanniocalcin (STC) as the active component. Stanniocalcin is a possible regulator of mineral metabolism. The composition is useful as a prophylactic and/or therapeutic agent for bone diseases such as osteoporosis. The present sequence represents human stanniocalcin which was used in an exemplification of the invention.  
 KeyWords: Human;stanniocalcin;STC;osteogenesis;bone disease;osteoporosis;mineral metabolism regulator;prophylaxis;therapy.  
 Organism Homo sapiens.  
 Sequence Composition Sequence 247 AA; 22 A; 18 R; 15 N; 11 D; 0 B; 11 C; 11 Q; 17 E; 0 Z; 7 G; 7 H; 11 I; 22 L; 13 K; 5 M; 9 F; 7 P; 25 S; 13 T; 0 W; 5 Y; 18 V; 0 Others;  
 :  
 Sequence: >AAB23264 JP2000229880-A PA (SNOW ) PR 10-FEB-1999 PF  
 10-FEB-1999 Human stanniocalcin. [Homo sapiens.]  
 MLQNSAVLLVLVISASATHEAEQNDSVSPRKSrvAAQNSAEVVRCLNSALQVGCgAFACL  
 ENSTCDTDGMYDICKSFLYSAAKFDTQGKAFVKESLKCIAngVTSKVFLAIRRCSTfQRM  
 IAEVQEECYSKLNVCSIAKRNP EAITEVvQLPNHFSNRYYNRLVRSLLCEDEDTVSTIRd  
 SLMEKIGPNMASLFHILQTDHCAQTHPRADFNRRRTNEPQKLKVLRLRNGEEDSPSHIK  
 RTSHESA